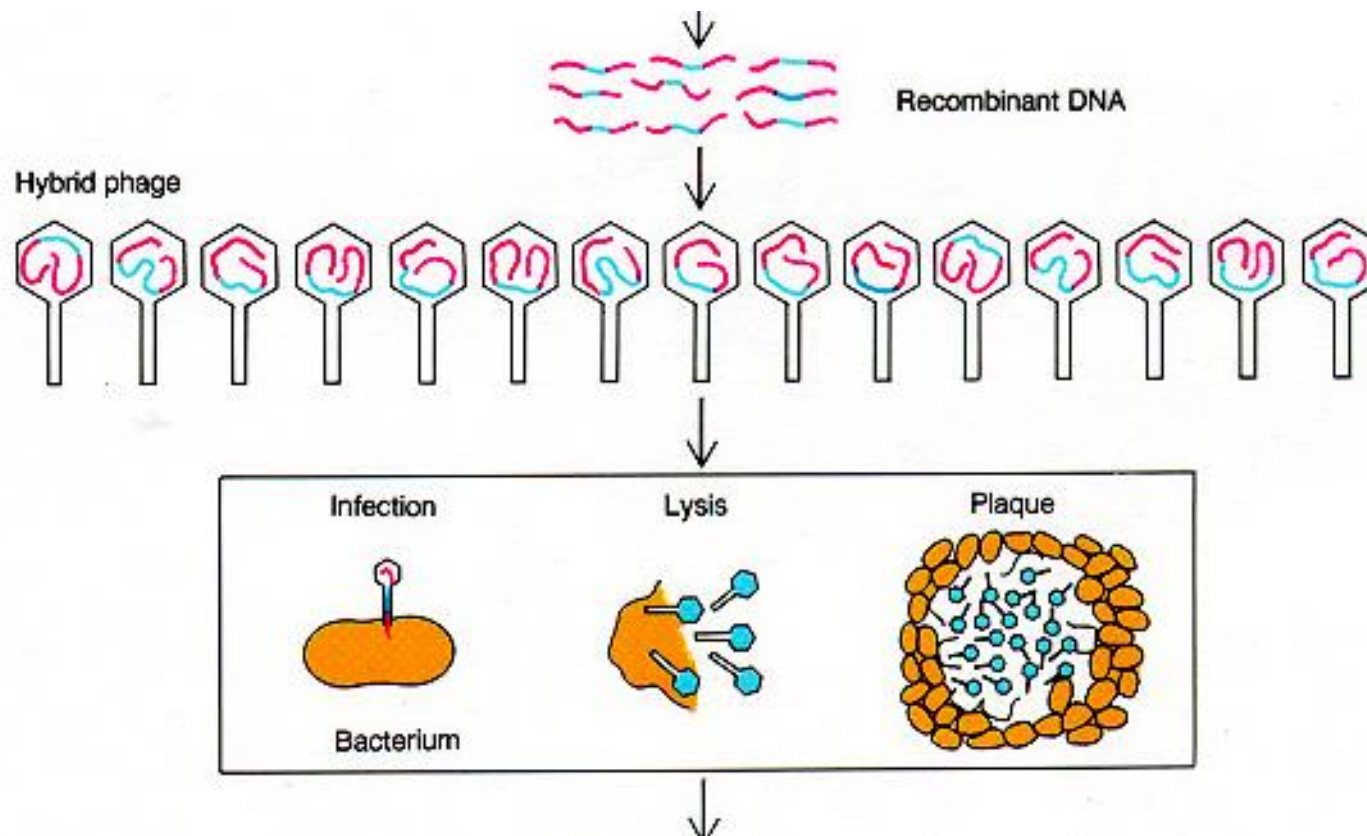


Tehnologija rekombinantne DNK

- Kloniranje -



KLONIRANJE

Osnovna tehnika genetičkog inženjeringa je **kloniranje**.
Kloniranje u najširem smislu je proces koji označava stvaranje identične kopije nečega.

To je bespolno razmnožavanje jednoćelijskih ili višećelijskih organizama i dobijanje identičnih kopija, odnosno **namjerno stvaranje kopija molekule ili ćelije ili cijelog organizma.**

Različiti nivoi kloniranja:

- kloniranje molekula DNK, tj molekularno kloniranje,
- kloniranje na nivou ćelije - ćelijsko kloniranje,
- kloniranje cijelog organizma.

Molekularno kloniranje je replikacija jednog molekula DNK ili dijela molekule DNK, počevši od jedne ćelije i generiše veliku populaciju ćelija koje sadrže identične DNK molekule.

Otkriće restrikcioniha endonukleaza omogućilo je dobijanje tačno određenih fragmenata DNK, odnosno određenih gena, koji se dalje kloniraju i time mnogostruko umnožavaju.



Kloniranje na ćelijskom nivou je proces stvaranja (umnožavanja) velikog broja ćelija jednog ćelijskog tipa iz samo jedne jedine ćelije .

Na bazi nekih markera, bojenja ili nekog fenotipa identifikuju se i izdvaja se samo jedan tip ćelija ili samo jedna ćelija i mnoštvom mitozama se namnoži veliki broj istih, identičnih ćelija.

Kloniranje na nivou cijelog organizma – još se naziva i **reproduktivno kloniranje**, a predstavlja bespolno umnožavanje cijelog višećelijskog organizma i dobijanje potpuno identičnih organizama (kopija životinja ili ...). Bespolno razmnožavanje kod biljaka i nekih vrsta insekata je uobičajen prirodni fenomen (vegetativno razmnožavanje) i to nije tako kompleksno, ali kod životinja je to vrlo kompleksno i rijetko se izvodi, ali može.



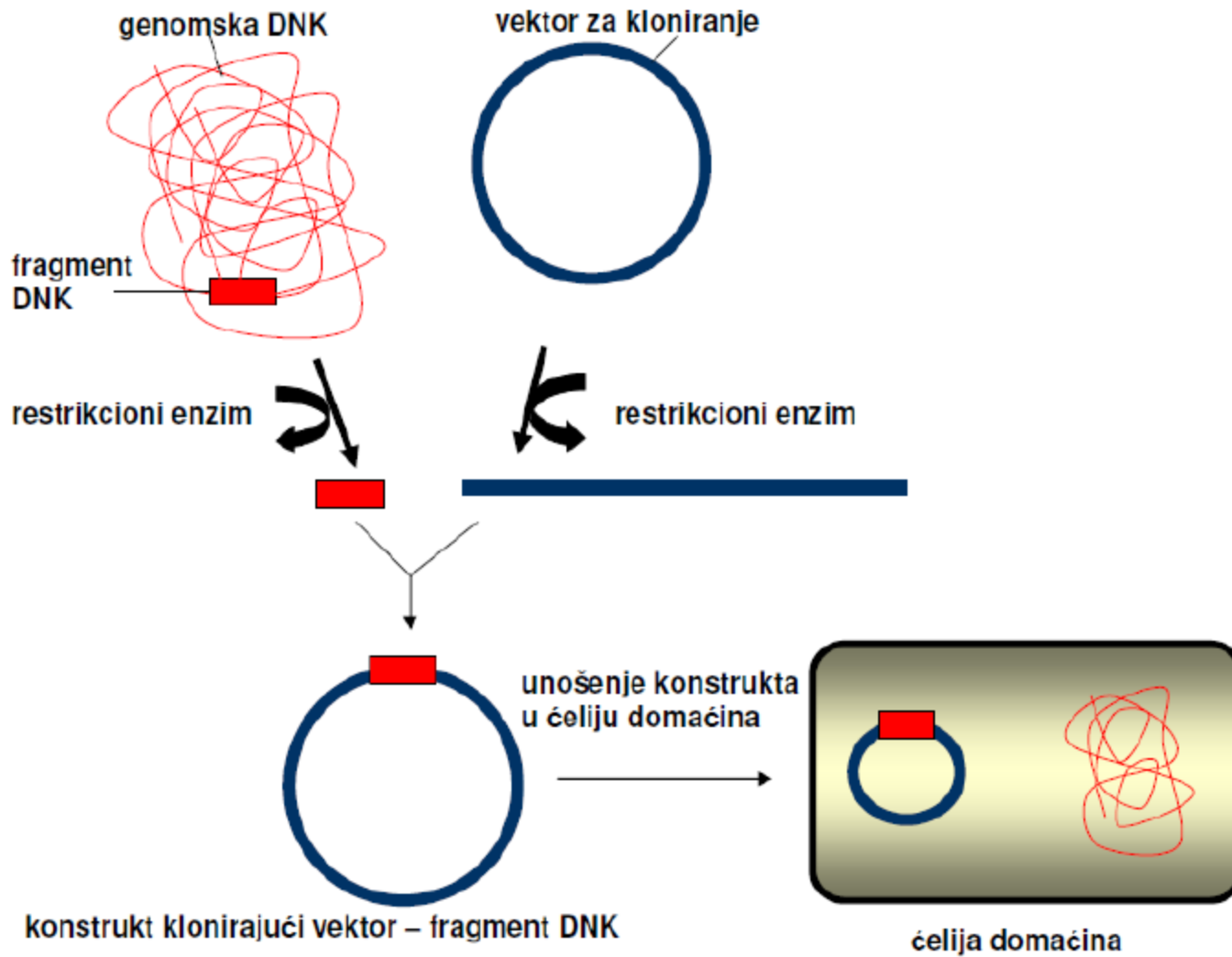
KLONIRANJE NA MOLEKULARNOM NIVOU

Kloniranje na molekularnom nivou može biti ``in vivo`` i ``in vitro``.

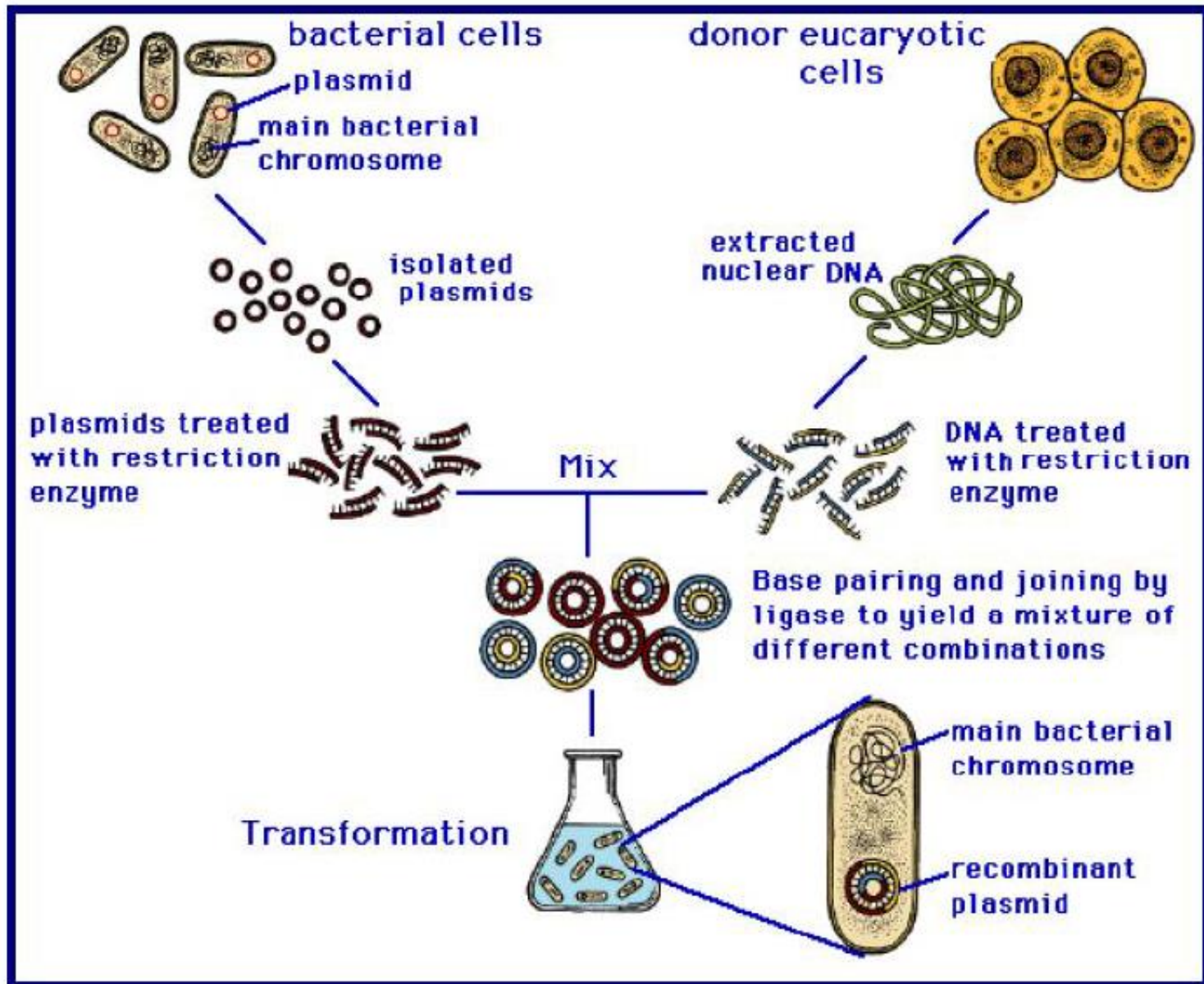
In vivo kloniranje DNK uključuje 5 osnovnih postupaka:

1. Izolacija genomske DNK iz ćelija vrste koja se klonira i isijecanje dijelova DNK na tačno određenim mjestima pomoću specifičnih restriksijskih enzima – endonukleaza.
2. Odabiranje male molekule DNK sposobne za samoumnazanje, tj. odabiranje klonirajućeg vektora (virusa) koji je prenositelj i kovalentno povezivanje dvije molekule DNK (DNK vektora i isječka željene DNK) Molekulska “ljepilo” u ovom slučaju je DNK-ligaza koja povezuje klonirajući vektor s DNK koju treba klonirati.
3. Unos rekombinantne DNK u ćeliju domaćina koja osigurava enzimsku mašineriju za umnažanje (replikaciju) DNK.
4. Kultivisanje kompleksa domaćina - vektora na hranljivim podlogama radi dobijanja brojnih kopija fragmenta DNK ugrađenog u vektor.
5. Probiranje (selekcija) ili identifikacija ćelija domaćina koje sadrže rekombinatnu DNK.

Osnovni postupci u tehnologiji rekombinovane DNK



Kloniranje – rekombinovani plazmid



Kao polazni materijal za kloniranje može se koristiti:

- **cio genom (genomska DNK** dobijena procesom ekstrakcije ili izolacije DNK iz određenih tkiva) nekog eukariotskog organizma koji se dalje obrađuje restrikcionim enzimom,

Molekule DNK eukariota su diskontinuirane (imaju kodirajuće i nekodirajuće sekvence),

Važno je da se u vektor ugradi DNK iz koje su eliminisani introni.

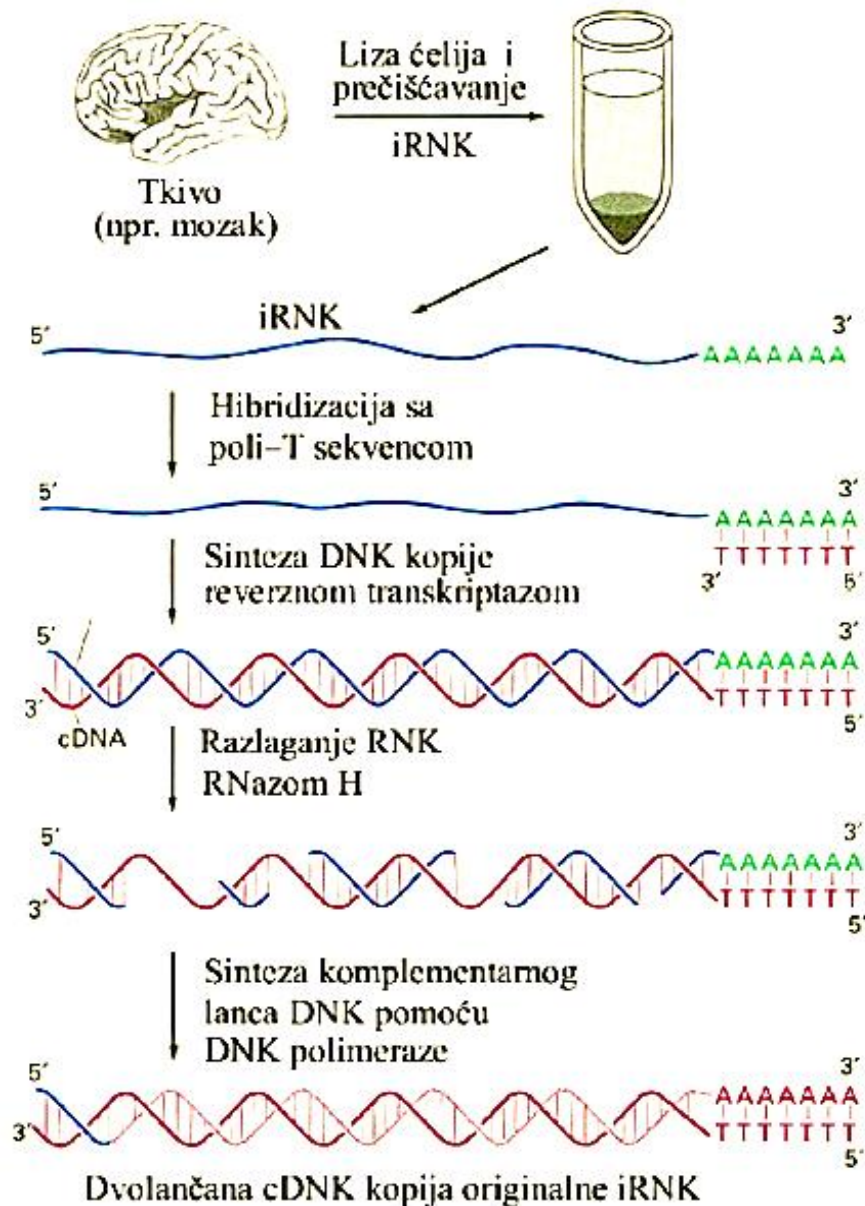
To se može postići korišćenjem **DNK dobijene sintezom od iRNK** pomoću enzima **reverzne transkriptaze** tako da nastaje **komplementrana DNK (cDNK).**

Ovo je pogodno jer:

iRNK nema introna ni kontrolnih sekvenci, a u ćeliji ima više iRNK nego DNK.



Postupak sinteze cDNK



Kada se cDNK ugradi u vektor na takav način da se može ispoljiti do nivoa genskog produkta (proteina), tada će se u ćeliji bakterije *sinetetisati eukariotski protein.*



Alternativna strategija kloniranja DNK podrazumeva **izdvajanje sekvenci DNK koje kodiraju proteinske molekule**.

Pri tome, prvi korak predstavlja izolacija iRNK ili prečišćene frakcije iRNK molekula i sintetisanje komplementarne DNK (cDNK) dejstvom reverzne transkriptaze.

Jednolančani molekuli DNK sintetisani reverznom transkriptazom prevode se u dvolančane dejstvom DNK polimeraze i zatim se ugrađuju u **odgovarajući vektor**, nakon čega se pristupa njihovom kloniranju.

Kolekcija klonova izvedena na osnovu iRNK naziva se **cDNK bibliotekom**.

cDNK biblioteka sadrži delove genoma koji nose aktivne gene.

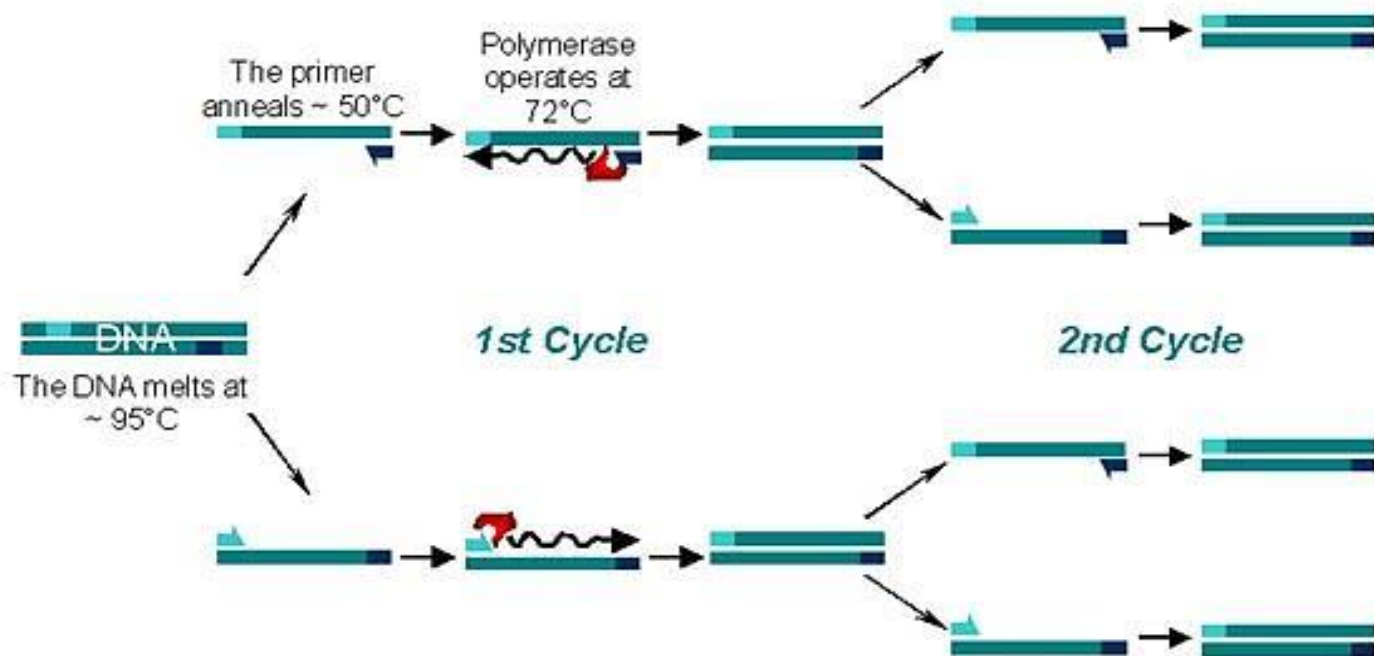
Skup klonova koji nose u fragmentima ekvivalent svih hromozoma nekog organizma naziva se **genomskom DNK bibliotekom**.

Genomska biblioteka idealno sadrži sve delove genoma jednog organizma.

In vitro kloniranje DNK molekule

REAKCIJA LANČANE POLIMERIZACIJE (PCR – POLIMERASA CHAIN REACTION)

Principle of the PCR



PCR je tehnika "in vitro" kloniranja DNK fragmenta.

Ako cilj nije da dođe do sinteze proteina, već samo do umnožavanja sekvence neke DNK, onda nema potrebe da se koristi kloniranje.

U tom slučaju koristi se **Polymerase Chain Reaction,**

» **Kary Mullis je osmislio PCR – 1983**

» **1993 Nobelova nagrada za hemiju**

- mala količina specifičnog regiona DNK se umnožava (milionske kopije),
- i koristi se za dalja istraživanja i testiranja.

(DNK region može biti gen ili sekvenca).

Proces izvođenja PCR-a može se podijeliti u 3 koraka:

- izolacija DNK ili RNK iz uzorka i priprema PCR smješe,
- zatim PCR reakcija, i na kraju
- identifikacija PCR produkata.



UZORAK BIOLOŠKOG MATERIJALA KOJI SLUŽI ZA IZOLACIJU DNK

1. Leukociti periferne krvi
2. Epitel bukalne sluznice
3. Amnionske tečnosti
4. Horionskih čupica
5. Bioptičkog tkiva
6. Autopsijskog tkiva
7. Urin
8. Sjemena tečnost
9. Cerebrospinalna tečnost
10. Korijen dlake i kose
11. Krvne mrlje
12. Pljuvačka

Metode izolacije – brojne

Cilj je da se postigne dobra čistoća i homogenost DNK uzorka

Danas su u upotrebi **kitovi za brzu izolaciju DNK i RNK** - lakši su za upotrebu

Nisu toksični, brzi su i jednostavni

Fenol – hloroformska ekstrakcija – klasična metoda, toksična, ali je dobar kvalitet DNK

POLYMERASE CHAIN REACTION - PCR

za PCR smješnu potrebno je:

- Izolovana DNK
- Dva specifična prajmera (engl. primer)
- Termostabilnu polimerazu (Taq)
- Smjesu 4 dNTP
- Mg^{2+} ($MgCl_2$)
- Odgovarajući pufer

Lančanom reakcijom polimeraze možemo u svega nekoliko sati dobiti milijarde identičnih kopija nekog ciljanog fragmenta DNA



Prajmeri

- Sintetski jednolančani oligonukleotid
- Dužina od 14 do 40 nukleotida
- G/C sadržaj od 40 do 75%
- Balansirana distribucija G/C i A/T bogatih regiona
- Tačka topljenja od 42 do 65 C
- Optimalna koncentracija od 0.1 do 0.6mM
- Ne sadrže 3' kraj komplementaran 3' kraju drugog prajmera u PCR jer mogu međusobno hibridizovati i poslužiti kao matrica što za rezultat ima **prajmer drajmer** artefakt

Rastvori dNTP - za svaki od 4 nukleotida (ATGC) pH neutralni. Najčešće korišćena koncentracija dNTP-a je 20 - 200 μ M svakog nukleotida u finalnoj PCR smeši.



Joni Mg^{2+} u obliku $MgCl_2$ su neophodni za PCR reakciju, jer se vezuju za nukleotide koji se jedino u formi kompleksa sa jonima Mg^{2+} mogu ugraditi u rastući lanac DNK tokom polimerizacije. Koncentracija jona Mg^{2+} varira od 0,5 do 5 mM.

PCR Pufer se koristi za održavanje odgovarajuće pH sredine u PCR smješi. Najoptimalnija pH sredina je 7. Finalna zapremina PCR smeše kreće se od 25 do 50 μ L.

Taq polimeraza

Ključna komponenta u postupku "in vitro" kloniranja – PCR reakcije

Izolovana iz bakterije **Thermus aquaticus**

DNK polimeraza termostabilna je čak i na 95 C.

DNK polimeraza koristi DNK kao matricu za sintezu komplementarnog DNK lanca.

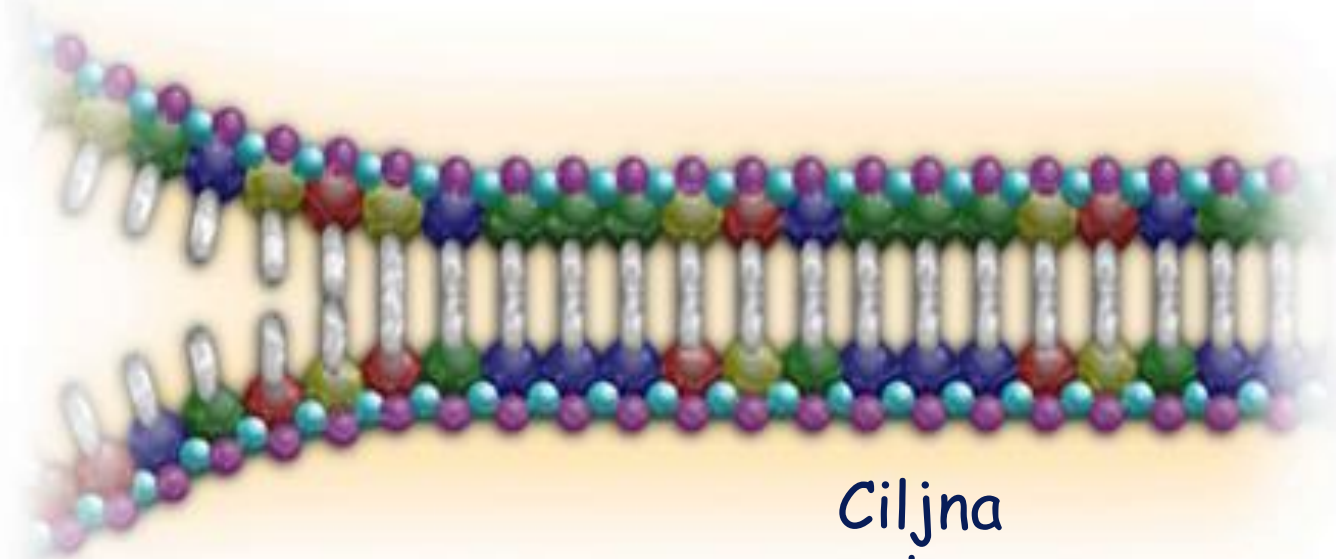


PCR reakciju čine sljedeće faze:

- denaturacije DNK matrice - template,
- faza hibridizacije (vezivanja) prajmera i
- faza elongacije – izduživanja .

FAZA DENATURACIJE

- Raskidaju se vodonične veze između 2 komplementarna lanca DNK molekula,
- to se postiže inkubacijom na 95°C tokom 3-5 minuta

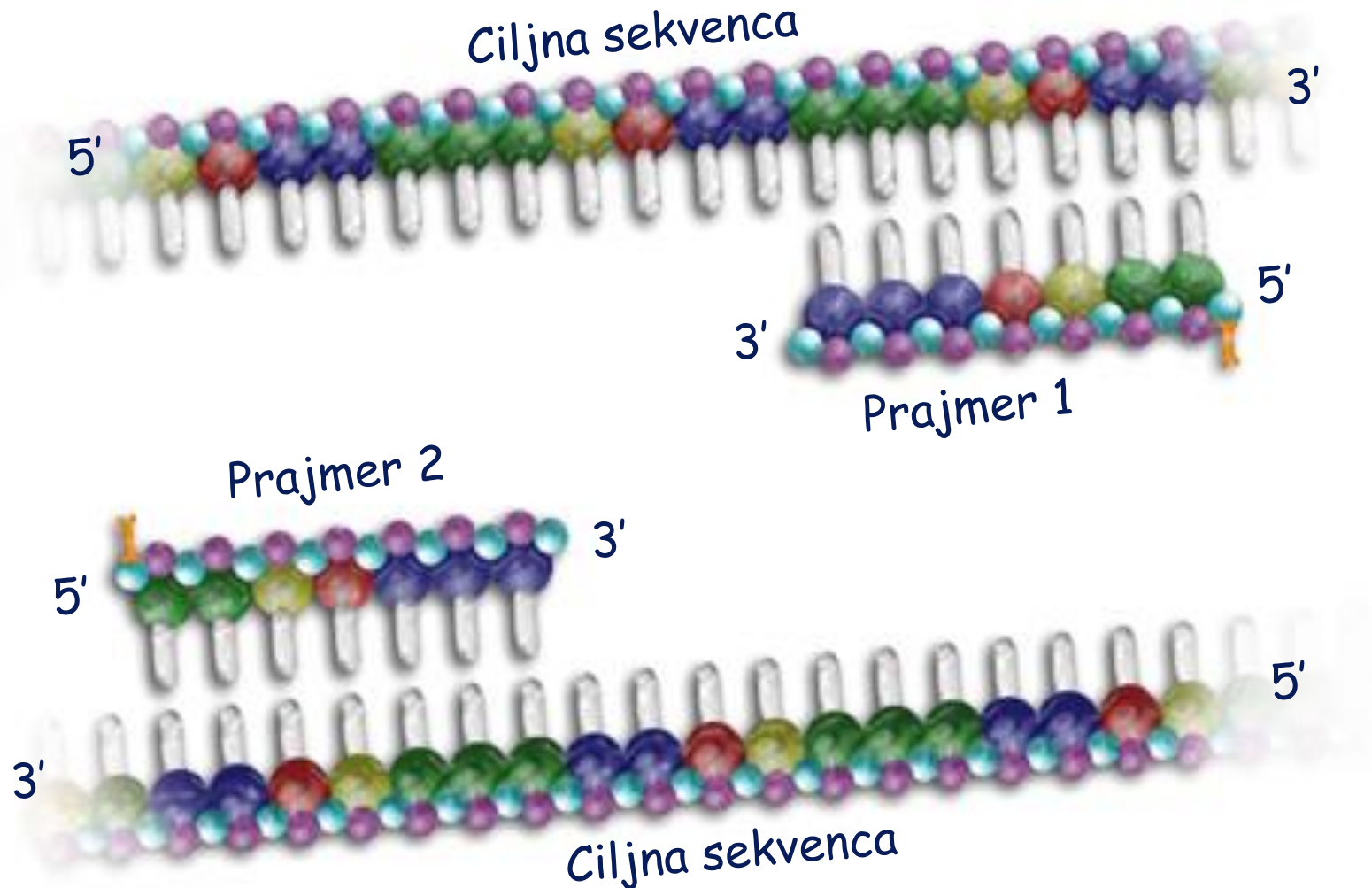


Ciljna
sekvenca



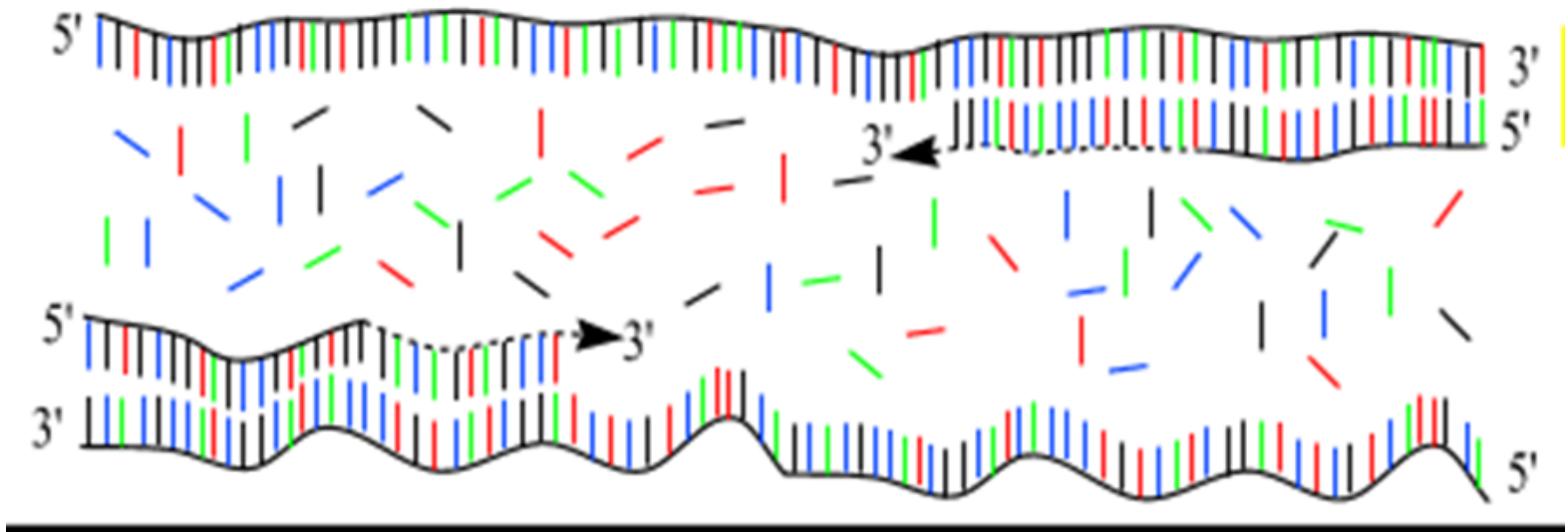
Korak 2. Vezivanje prajmera

Temperatura se automatski snižava (varijacije idu od 42°C do 65°C) u trajanju od 20 sekundi do 1 minuta



Elongacija - izduživanje

DNK polimeraza duplira DNK lanac
Optimalna temperatura 72C

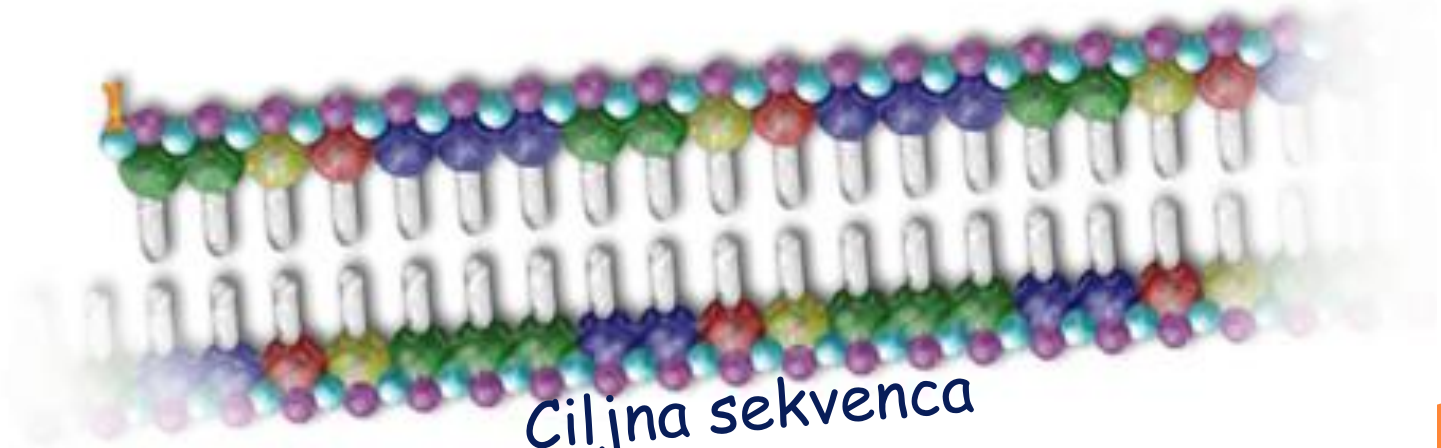


Kompletirana jedan PCR ciklus

Ciljna sekvenca



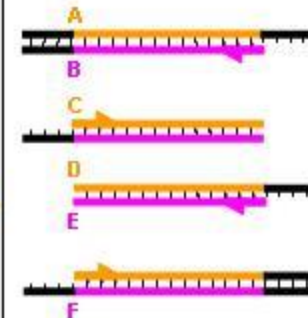
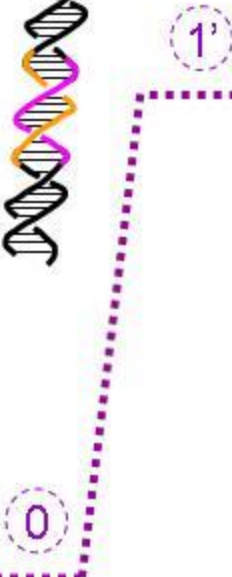
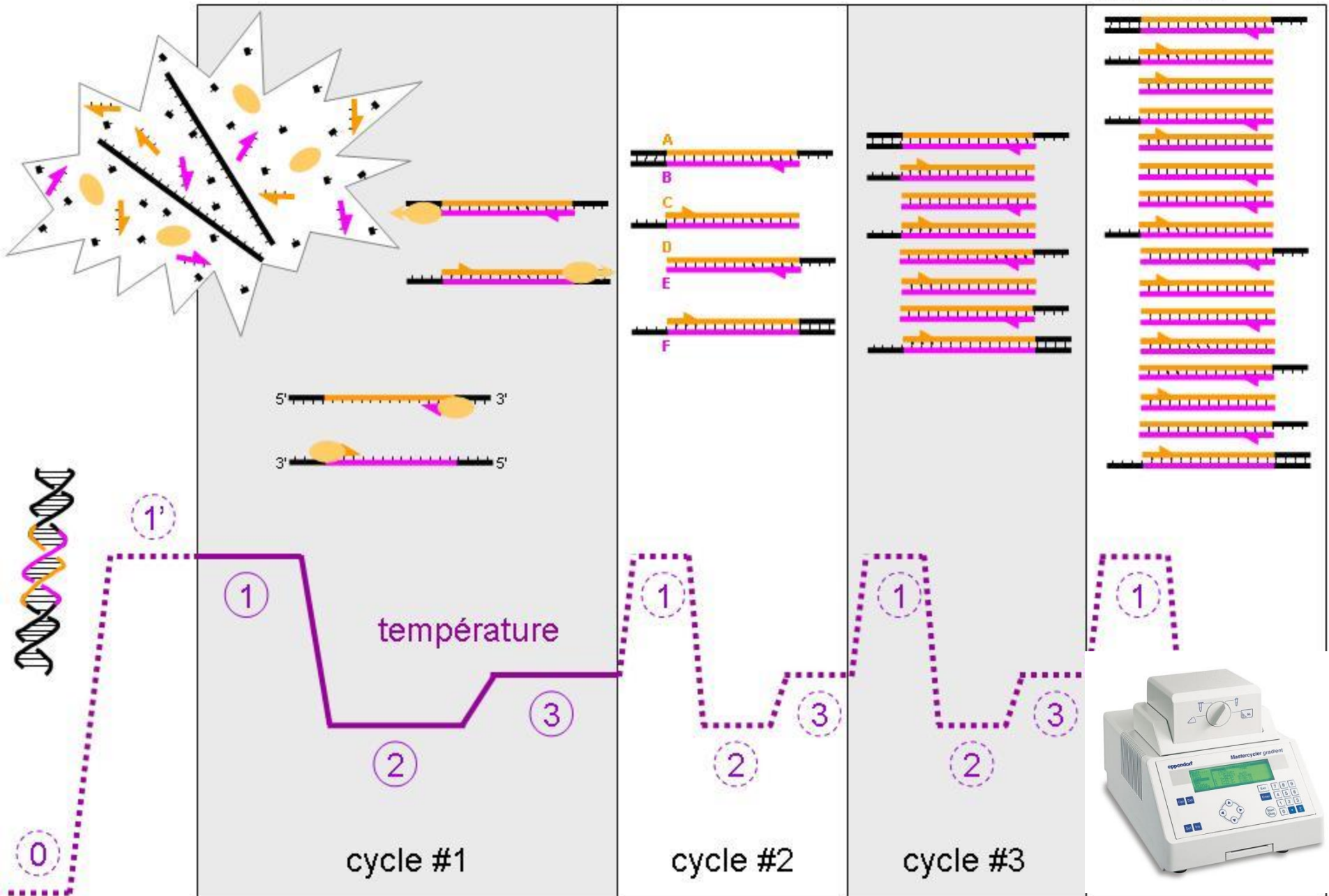
Ciljna sekvenca



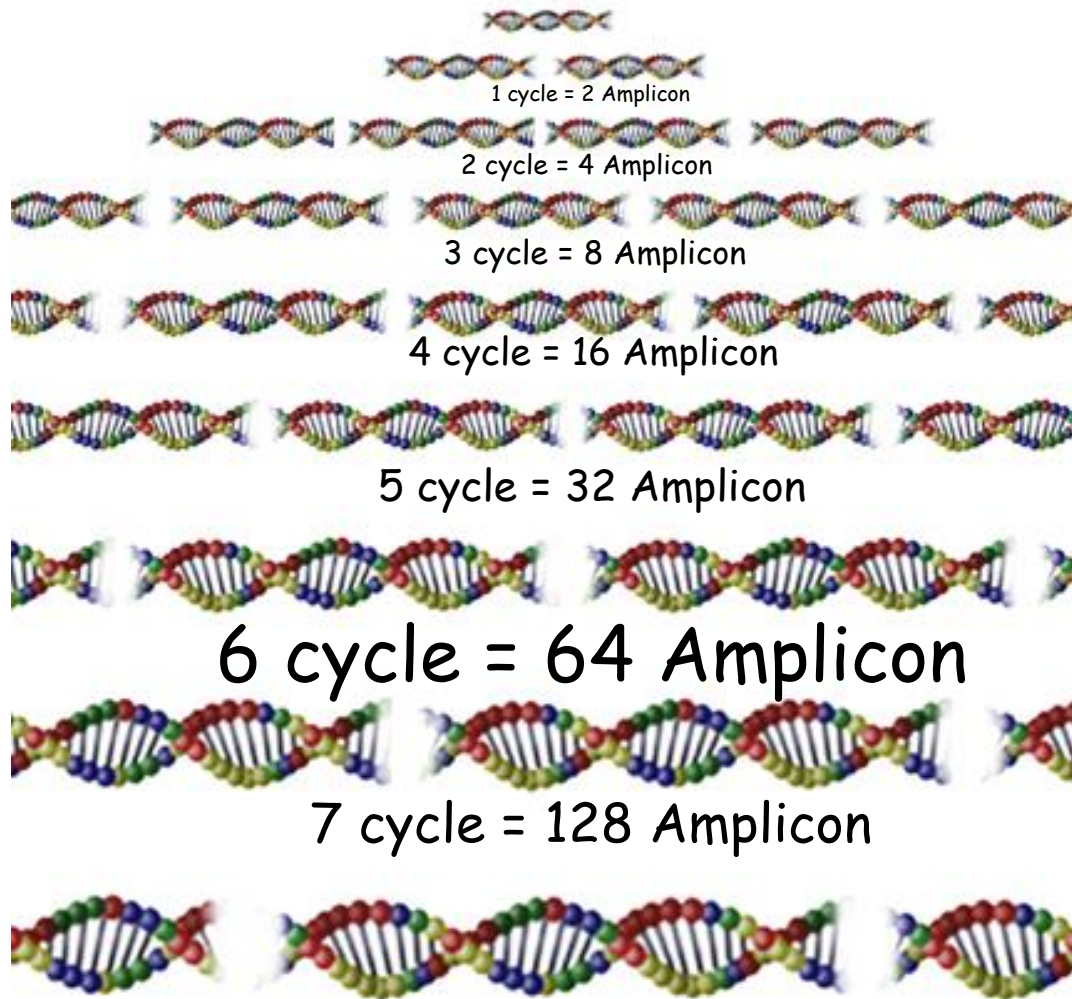
Dobijaju se 2 kopije ciljne sekvence




cycle #n>



PCR Amplifikacija

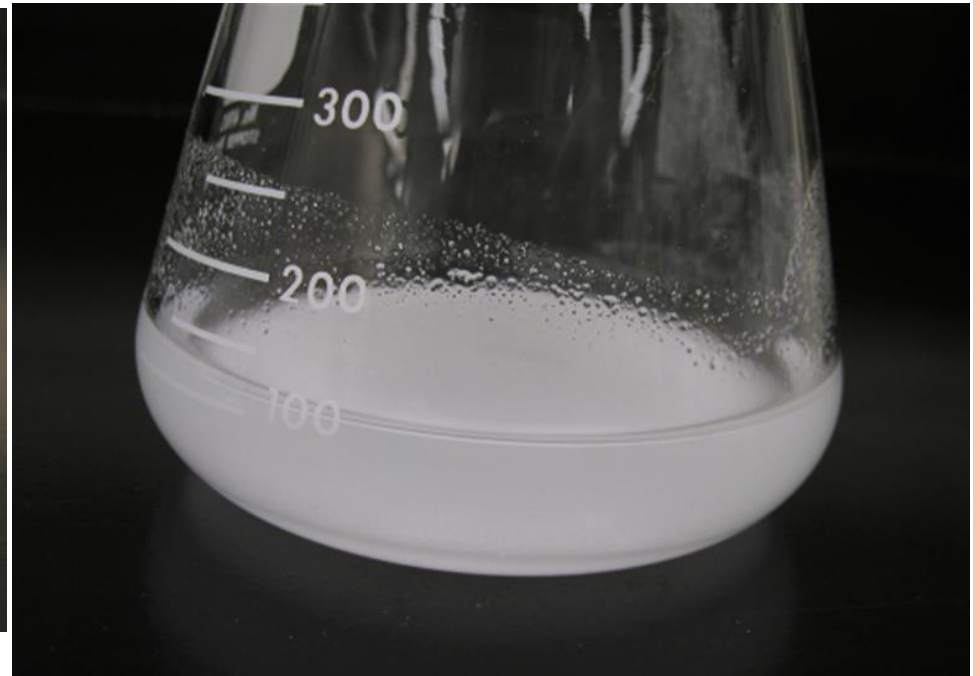


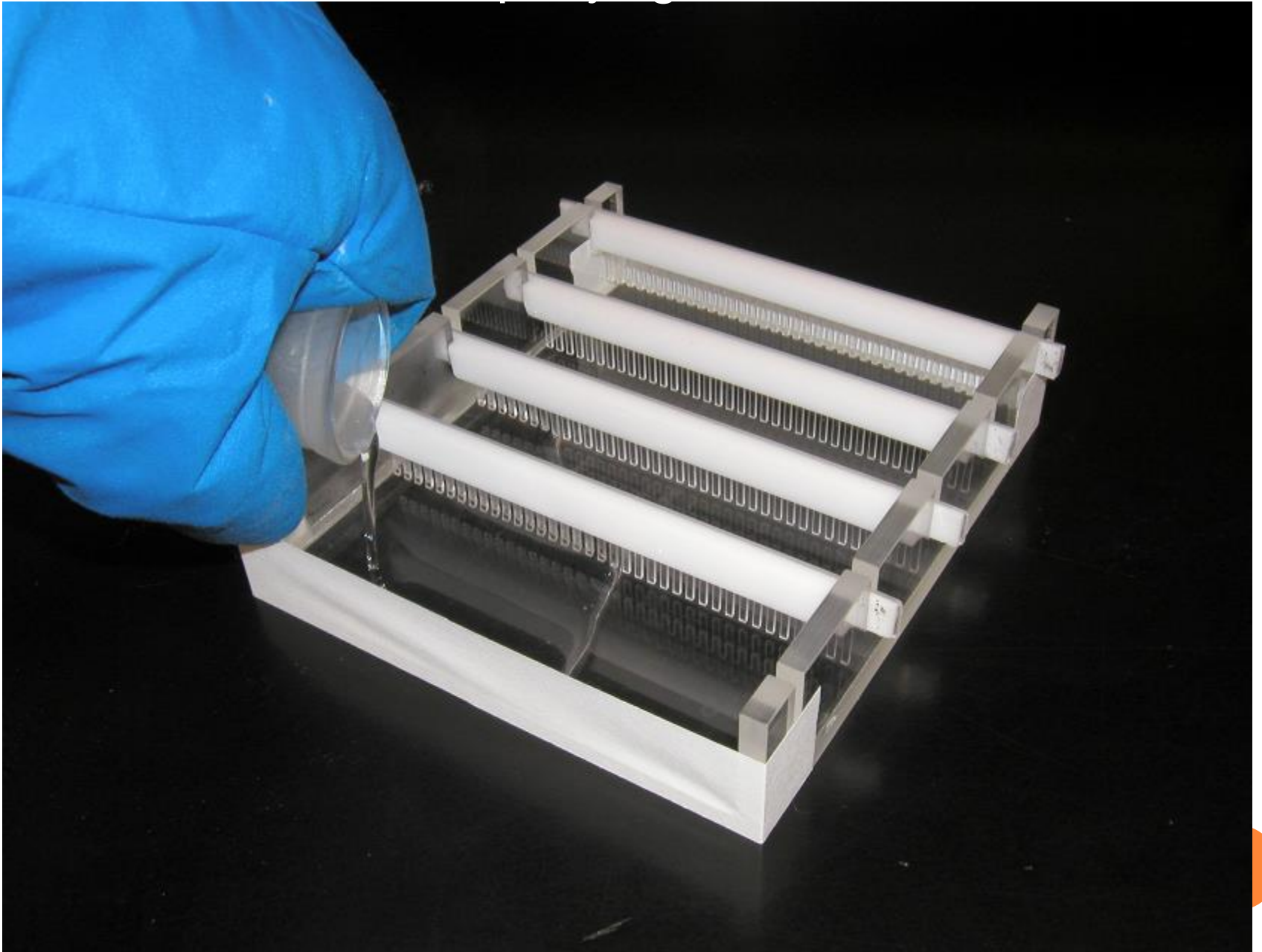
No. of Amplicon Cycles	No. Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,8
	24 

IDENTIFIKACIJA PCR PRODUKATA

Posle PCR reakcije vrši se identifikacija – provjera PCR produkta procesom gel elektroforeze.

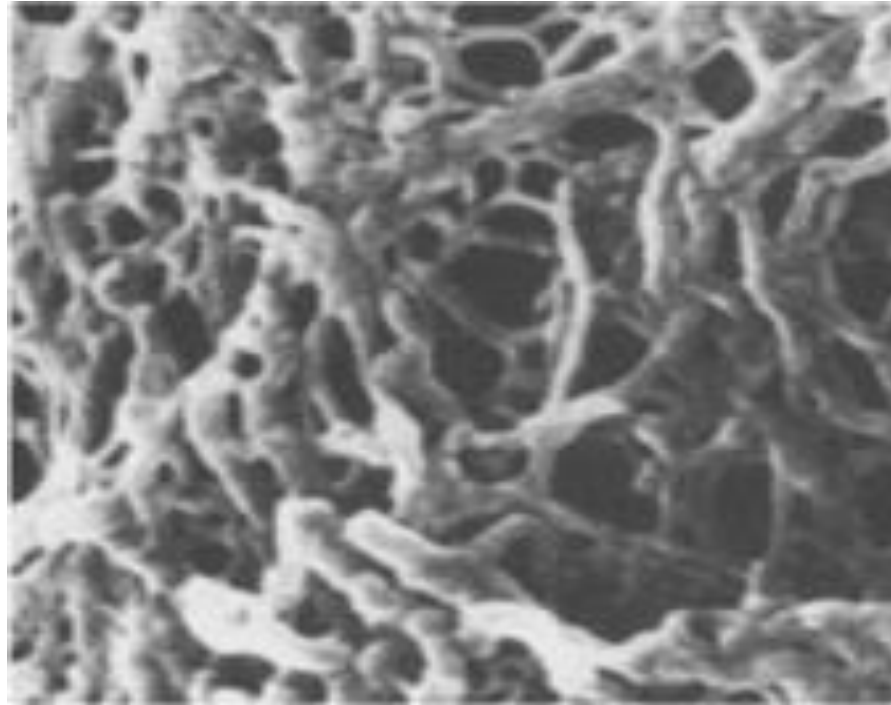
To je tehnika razdvajanja DNK molekula i njihovih fragmenata u zavisnosti od njihove veličine a pod uticajem indukovanog električno polja.





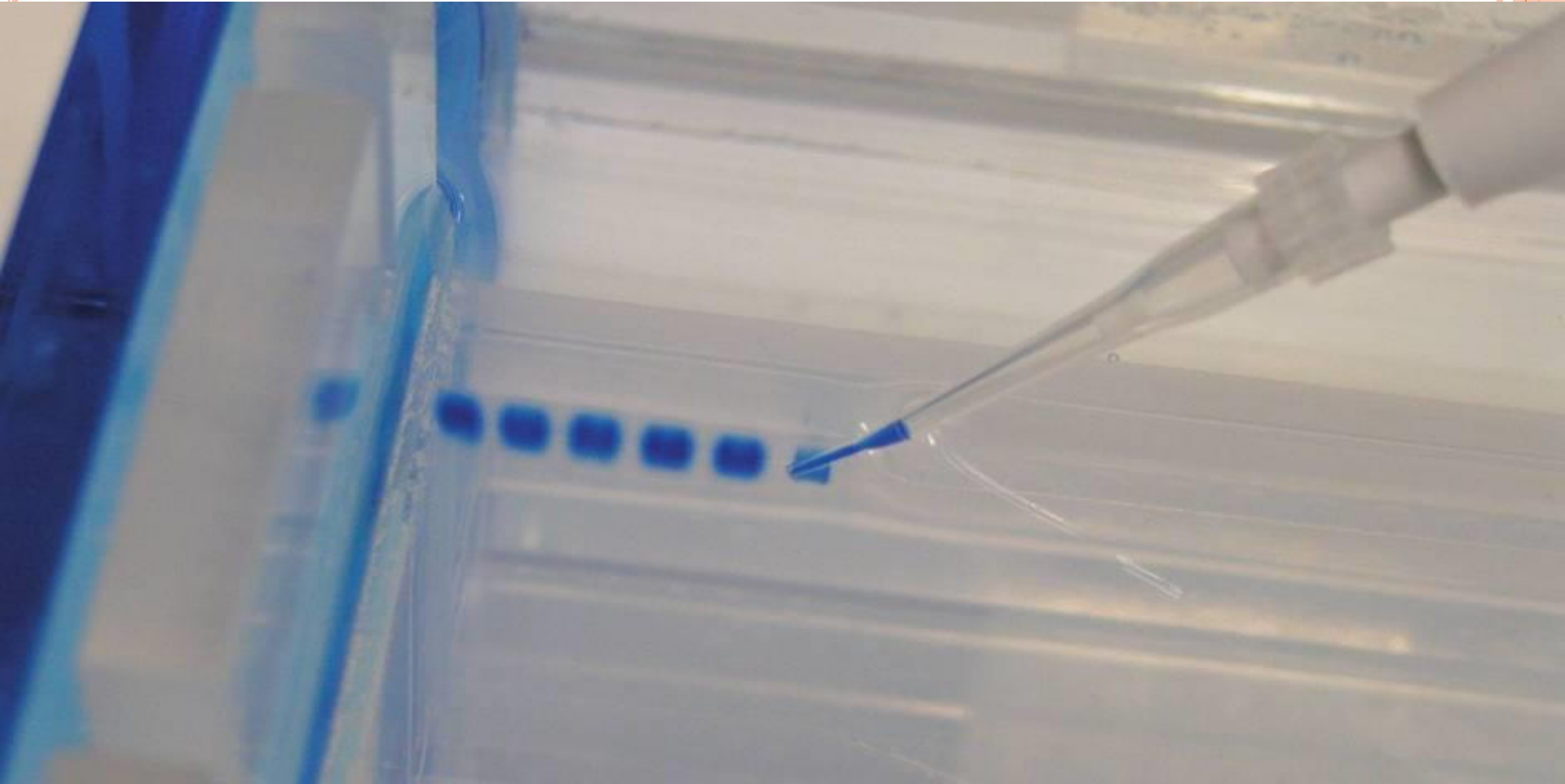
DNK je negativno naelektrisana.

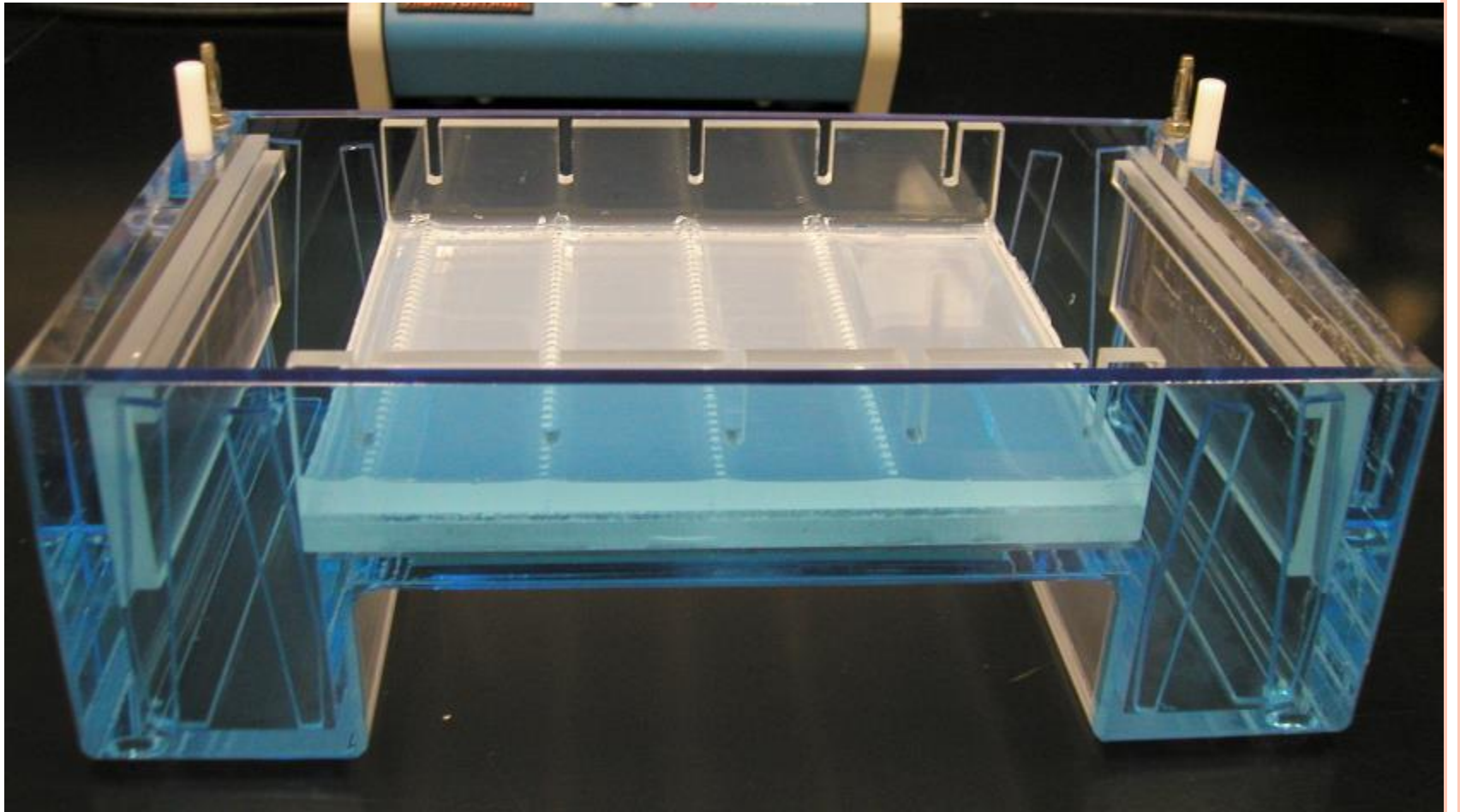
U električnom polju, DNK će migrirati u pravcu pozitivnog pola (anoda).



Agarozni gel se koristi da bi usporio kretanje DNK i razdvojio fragmente u skladu sa dužinom.

Punjenje gela





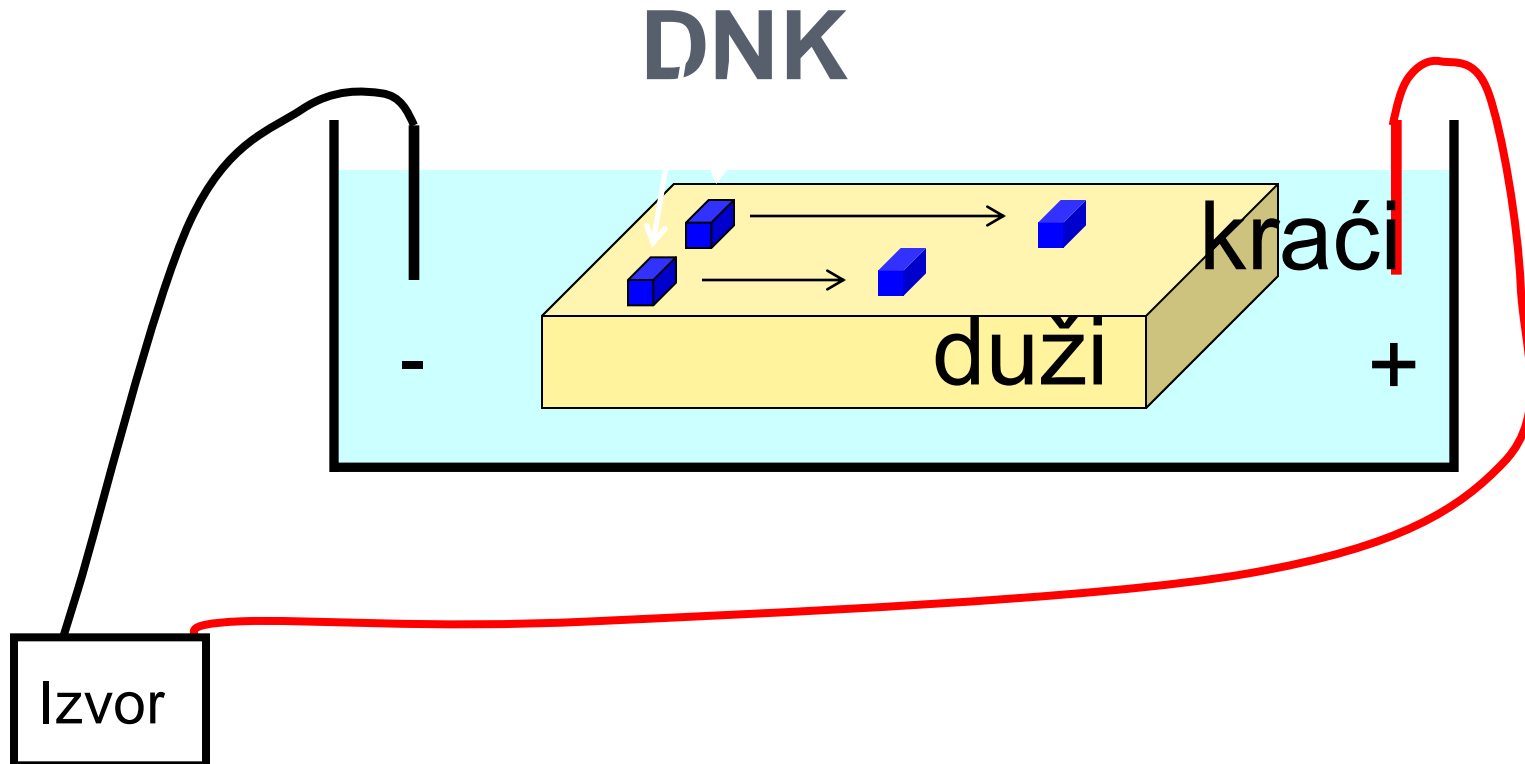
Koliko brzo će migrirati DNK kroz gel?

Jačina el. polja, pufer, gustina agaroznog gela...

Dužina DNK!

* Kraći fragmenti će putovati brže

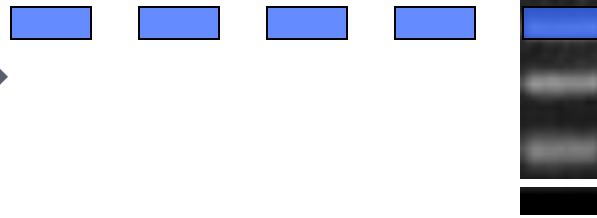
...gel elektroforeza razdvaja DNK u skladu sa dužinom



DNK Ladder Standard

Bromophenol blue
migrira kao 300 bp
DNK molekula

Bromophenol blue →



T20 T5 T0 ladder

